

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 526788

( P2003 - 526788A )

(43)公表日 平成15年9月9日 (2003.9.9)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード ( 参考 )
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	W
			D
33/543	545	33/543	545 A

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 25数 )

(21)出願番号 特願2001 - 566030(P2001 - 566030)

(86)(22)出願日 平成13年3月12日(2001.3.12)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月9日(2002.9.9)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/02894

(87)国際公開番号 W001/067108

(87)国際公開日 平成13年9月13日(2001.9.13)

(31)優先権主張番号 0005683.8

(32)優先日 平成12年3月10日(2000.3.10)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(31)優先権主張番号 0006064.0

(32)優先日 平成12年3月14日(2000.3.14)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 ユニヴェルシテ ドゥ ジュネーブ  
スイス国 セーアッシュ - 1211 ジュネーブ,  
カス ポスタル, リュ ジェネラル  
- デュフル 24

(72)発明者 ホーホシュトラーサー, ドウニ フラン  
ソワ  
スイス国 セーアッシュ - 1245 ジュネーブ,  
コロンジウ - ベルリヴ, シュマン  
デ ラ サヴォニエール 27

(72)発明者 サンチェ, ジャン - シャルル  
スイス国 セーアッシュ - 1208 ジュネーブ,  
シュマン フランク - トマス 42

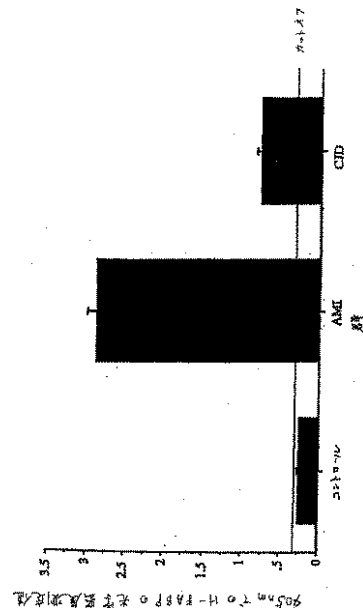
(74)代理人 弁理士 山本 秀策 ( 外 2 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 伝染性海綿状脳症のための診断アッセイ

## (57)【要約】

心臓および脳の脂肪酸結合タンパク質 ( H - F A B P、  
B - F A B P ) は T S E、特に C J D のためのマーカー  
である。本発明は、これらのマーカーのいずれかに関して、  
好ましくは、H - F A B P、B - F A B P に対する  
特異的な抗体を使用する酵素免疫アッセイによる診断ア  
ッセイを提供する。H - F A B P はまた、急性心筋梗塞  
( A M I ) に対するマーカーでもあることから、A M I  
から C J D を識別することは、A M I に対する特異的な  
アッセイ ( 例えば、マーカーとしてトロポニン - 1 また  
は C K - M B を使用して )、がまた実行されることを必要とする。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 伝染性海綿状脳症(TSE)に罹患すると予想される被験者から取られた体液のサンプルにおけるTSE、またはTSEの可能性についての診断アッセイの方法であって、

該サンプル中の心臓または脳の脂肪酸結合タンパク質(H-FABPまたはB-FABP)の濃度を決定する工程、  
を包含する、方法。

【請求項2】 前記被験者はヒトの患者であり、そしてH-FABPの濃度は第一のアッセイにおいて決定され、それによって、陽性の結果は、CJDまたは急性心筋梗塞のどちらかを示す、請求項1に記載の方法であって、

急性心筋梗塞(AMI)のみについて第二の診断アッセイを実行する工程であって、それによって、該H-FABPアッセイにおける陽性の結果、およびAMIについての該アッセイにおける陰性の結果は、該患者がCJDに罹患するか、または罹患し得ることを示唆する工程、  
を包含する、方法。

【請求項3】 AMIについての前記アッセイは、血漿中のトロポニン-1またはクレアチンキナーゼMBの濃度を決定する工程を包含する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 H-FABPについての前記アッセイにおいて、H-FABPに対する抗体が使用される、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】 前記被験者は、ヒトの患者であり、そしてマウス抗ヒトFABPモノクローナル抗体が使用される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 H-FABPについての前記アッセイは、サンドイッチELISA法を包含する、請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】 B-FABPと組合せたAMIについてのアッセイを何ら行うB-FABPまたはB-FABPに対する抗体が使用される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記H-FABPアッセイまたは前記B-FABPアッセイは、血漿または血清のサンプルについて実行される、請求項1～7のいずれかに

記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

(発明の背景)

(発明分野)

本発明は、タンパク質またはそれに対する抗体を使用する診断アッセイの分野にある。

**【0002】**

(関連した技術の記述)

伝染性海綿状脳症(TSE)は中枢神経系の神経変性の疾患である。それらは、伝染され得、遺伝され得、または散発的に発生し得、および動物において、例えば、ウシにおけるウシ海綿状脳症(BSE)またはヒツジにおけるスクレイピー、ならびにヒトにおけるクロイツフェルトヤコブ病(CJD)、ゲルトストマンシュトロイスラーシェインカー症候群、致死家族性不眠症またはクールーとして観察されている。それらは、長期の潜伏期間を有し、運動失調、痴呆、神経医学的障害および死をもたらす。神経病理学的変化としては、脳組織の空胞変性、大グリア細胞またはアミロイド斑の形成が挙げられる。これらの疾患は、死亡前に診断することが難しい。

**【0003】**

CJD患者の脳脊髄液(CSF)は、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、2つのさらなるポリペプチドを示す[Harrington, M. G. New England Journal of Medicine 315, 279 (1986), Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C. J., Lee, K. H., および Harrington, M. B. New England Journal of Medicine 335, 924 (1996)]。これらの14-3-3のポリペプチドの機能は、TSEにおいて不明確のままである。それらは、CJDの診断評価のために死亡前の試験において使用され得るが、低い特異性を有し得る。

**【0004】**

プリオンタンパク質の異常型に対するモノクローナル抗体は、入手可能であり

、そしてPCTの明細書WO98/23962およびWO98/32710ならびにSchmerr, M. J., the Beckman Coulter Pace Setter Newsletter 3(2)、1~4(1999年6月)に記載されるように酵素結合免疫アッセイにおいて使用され得る。しかし、これらの手順はまだ充分に開発されていない。

#### 【0005】

新しい非進襲性血液のCJDまたはBSEのマーカの開発は、医者が早期診断を確立するのを助ける。

#### 【0006】

(発明の要旨)

2つの脂肪酸結合タンパク質(FABP)(心臓(H-FABP)および脳(B-FABP)として知られている)は、TSEについてのマーカであることが今や、驚くべきことに見出された。従って、本発明は、TSEまたは罹患する予想される被験者から取られた体液のサンプルにおけるTSEの可能性に関する診断アッセイを提供し、このアッセイは、サンプル中の心臓または脳の脂肪酸結合タンパク質(H-FABPまたはB-FABP)の濃度を決定する工程を包含する。この方法は、ヒト患者におけるCJD、特に新しい改変体CJDの診断、およびウシのような反芻動物におけるBSEに特に適用可能である。

#### 【0007】

好都合なことに、この方法は、H-FABPまたはB-FABPに対する抗体を使用して実行され、それによって、抗体とサンプル中のFABPとの間の反応の程度は、アッセイされ、そしてサンプル中のFABPの濃度に関連付けられる。このように、決定された濃度を用いて、診断を行うか、または診断を行うにおいて支援をする。

#### 【0008】

本発明は、CJTに関して高い感受性、特異性および予測精度のアッセイを可能とする。「感受性」は、臨床試験でCJDが確認された患者から採取されたサンプルに対するアッセイによって与えられた真の陽性の割合と規定される。「特異性」はコントロールサンプル(すなわち、臨床試験ではCJDが示されなかつ

た患者からの)に対するアッセイによって与えられる真の陰性の割合を意味する。「予測精度」は、陽性の合計(真の陽性+偽の陽性)に対する真の陽性を表した比率を意味する。

【0009】

H-FABPは、急性心筋梗塞(AMI)の公知のマーカである(Ishii, J. et al., 「Serum concentrations of myoglobin vs human heart-type cytoplasmic fatty-acid binding protein in early detection of acute myocardial infarction」、Clinical Chemistry 1997; 43 1372~1378を参照のこと)。従って、ヒトにおけるCJDの診断のためのH-FABPについてのアッセイをより好都合に使用するために、CJDに関する診断からAMIアッセイにおいて陽性の患者を取り除くために、AMI(そのマーカはFABPでない)に関する別種のアッセイを実行することが望ましい。

【0010】

従って、具体的な実施形態において、本発明は、上記に規定されたように第一アッセイにおいてH-FABPの濃度を決定する工程を包含する方法を提供し、それによって、陽性の結果はCJDまたは急性心筋梗塞のどちらかを示す。そして、この方法は、急性心筋梗塞(AMI)のみについて、第二診断アッセイを実行する工程をさらに包含し、それによって、H-FABPのアッセイにおける陽性の結果、およびAMIについてのアッセイにおける陰性の結果は、この患者がCJDに罹病し得ることを示す。急性心筋梗塞(AMI)の初期の生化学的マーカとしてトロポニン-Iおよびクレアチンキナーゼ-MB(CK-MB)を使用するアッセイは、周知であり、そして上記の目的に適切である。

【0011】

類似のH-FABPおよびまた脳特異的脂肪酸結合タンパク質(B-FABP)は、マウスの脳において見出される(Pu, L. et al., Molecular and Cellular Biochemistry 198, 6

9~78(1999)を参照のこと)。脳のH-FABP(B-FABPと混同すべきでない)は、1アミノ酸置換の分、心臓のH-FABPと異なると考えられる。しかし、B-FABPはかなり異なる。Sellner, P. A. et al., 「Development role of fatty acid binding proteins in mouse brain」Dev. Brain Res. 89, 33~46(1995)は、DNA相同性が69%であると予測し、他方、A. Schreiber et al., 「Recombinant human heart-type fatty acid binding protein as standard in immunochemical assays」, Clin. Chem. Lab. Med. 36(5), 283~288(1998)は64%のアミノ酸配列相同性としており、およびヒトH-FABPに対するモノクローナル抗体はたった1.7%の程度でヒトB-FABPと交差反応性であることを記載する。

#### 【0012】

本発明は、H-FABPがCJDに関するマーカーであることを見出した今、B-FABPもまたそうであることは非常に合理的な予測である。B-FABPは、脳組織に対して特異的であり、そしてH-FABPに対するモノクローナル抗体と有意に反応しないようであることから、AMIに関して陽性を与えず、AMIに関して別々のアッセイを行うことが不必要となる。

#### 【0013】

(好ましい実施形態の説明)

アッセイの方法について、サンプルは、被験体の任意の好都合な体液から採取され得るが、好ましくは、血漿または血清(全血ではなく)から採取され得る。脳脊髄液(CSF)は、特に、ウシのような動物を試験する場合、別の有用な液である。

#### 【0014】

その方法は、上記に参照されたこれらを包含するTSEの全ての型、およびそれに罹患するまたは罹患すると予想される任意のヒトまたは動物に適用され得ると考えられる。特に、本発明は、新しい改変体、散发性および遺伝性(家族性)

のものを包含するヒトにおける全ての型のCJDに適用可能である。さらに、本発明は、ウシにおけるBSEおよび他の動物（例えば、シカ）におけるBSE様の疾患にも適用可能である。

#### 【0015】

マーカーであるH-FABPまたはB-FABPは、好ましくはH-FABPに対する特異的抗体を使用し、そして抗原（H-FABPまたはB-FABP）/抗体相互作用の程度を測定する免疫アッセイによって測定される。ヒトの患者の診断に関して、この抗体は、好ましくは抗ヒトH-FABPまたは抗ヒトB-FABPである。同様に、被験体が動物であったとき、この抗体は、好ましくは同じ動物の種類H-FABPまたはB-FABPに対する抗H-FABPまたは抗B-FABPである（例えば、患者がウシのとき、抗ウシH-FABPまたは抗ウシB-FABP）。しかし、それらは種間で抗体のいくらかの交差反応があり、頻繁に異種の抗体が使用され得る；例えば、抗ラット/マウスH-FABPは、ウシにおけるBSEの検出に使用され得る。それはモノクローナル抗体（都合の良いことには、マウス）または操作された抗体があり得る。好ましくは、マウス抗ヒト、抗ウシなどのモノクローナル抗体が使用される。H-FABPに対する抗体は公知である（例えば、66E2および67D3は、Roos, W. et al., 「Monoclonal antibodies to human heart type fatty acid-binding protein」, J. Immunol. Methods 183 149~153 (1995) によって記載されている）。抗体66E2は市販されている。また、通常のKohler-Milstein方法を使用して、H-FABPまたはB-FABP抗体を惹起し得る。この目的のためのタンパク質の供給源は、天然に誘導されるか、または組換えDNA調製タンパク質であり得る。組換えヒトH-FABPおよびB-FABPは、Schreiber, A. (前出) および Shimizu, F. et al., 「Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid binding protein (B-FABP)」, Biochim Biophys. Acta 1354, 24~28 (1997) によって

それぞれ記載されている。あまり好ましくはないが、その抗体はポリクローナルであり得る。

#### 【0016】

任意の公知の免疫アッセイの方法が使われ得る。サンドイッチアッセイが好ましい。この方法において、F A B Pに対する第一の抗体は、プラスチックマイクロタイタープレートのウェルのような固定相に結合され、そしてサンプルおよび検出されるべきH - F A B PまたはB - F A B Pに対して特異的な、標識された第二の抗体とともにインキュベートされる。あるいは、抗体捕捉アッセイはここにおいて使用され得、試験サンプルは固定相に結合しておき、次いで抗F A B P抗体が添加され、そして結合され得る。結合していない材料を洗い流した後、固定相に結合した抗体の存在または量は、標識された第二の抗体（第一の抗体に対する抗F A B P）を使用して決定される。

#### 【0017】

別の実施形態において、競合アッセイは、そのサンプルと標識されたF A B PまたはF A B Pに由来するペプチドとの間で実行され得、これらの2つの抗原は、固体支持体に結合される限定された量の抗F A B P抗体に対して競合する。標識されたF A B Pまたはペプチドは、固定相で抗体とともにプレインキュベートされ得、それによって、サンプル中のF A B Pは、抗体に対して結合されるF A B Pまたはそのペプチドの一部に置き換わる。

#### 【0018】

さらに別の実施形態において、2つの抗原は、抗体と単一の共インキュベーションにおいて競合される。洗浄による支持体から結合していない抗原の除去後、その支持体に付着した標識の量が決定され、そしてサンプル中のタンパク質の量は、以前に確立された標準滴定曲線を参照することによって測定される。

#### 【0019】

標識は好ましくは酵素である。酵素のために基質は、色素形成性、蛍光性または化学発光性であり得る。

#### 【0020】

増幅されるアッセイの型を使用することは非常に好ましく、それによって、増

強される「シグナル」は、相対的に低いレベル検出されるべきタンパク質から生成される。増幅される免疫アッセイの1つの特定の型は、増強された化学発光物質(ELC)アッセイである。ここで、抗体は、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼで標識され、西洋ワサビペルオキシダーゼは、ルミノール、ペルオキシダーゼ基質、ならびに放射光の強度および期間を増強する化合物(代表的には4-ヨードフェノールまたは4-ヒドロキシ桂皮酸)との化学発光反応に参与する。

#### 【0021】

別の好ましい増幅された免疫アッセイの型は免疫PCRである。この技術において、抗体は、PCRプライマーを包含する任意のDNAの分子に共有結合的に結合され、それによって、任意のDNAに付着した抗体をともなうDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応法によって増幅される(Hendrickson, E. R. et al., *Nucleic Acids Research* 23, 522-529 (1995)およびSano, T. et al., 「*Molecular Biology and Biotechnology*」ed. Robert A. Meyers, VCH Publishers, Inc. (1995), pages 458~460を参照のこと)。そのシグナルは、前に記載されるように読み出される。

#### 【0022】

特に好ましい手段において、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)は、血清中のH-FABPを検出するように開発された。H-FABPはまたAMIについてのマーカーでもあることから、トロポニン-IまたはCK-MBのレベルをアッセイして、任意の心臓障害を除いた。実施例において記載されるように、これらのアッセイは、系列的な血漿およびCSFのサンプル(AMIおよびCJDを欠く患者、AMIをともなう患者、痴呆をともなう患者および検死解剖を経て確認されたCSFをともなう患者からの)において評価された。適切なカットオフのレベルを超えたCJDにおいてH-FABPに関する感受性、特異性および予測精度は全て100%であった。従って、トロポニン-IまたはCK-MBと結合されるH-FABPの検出アッセイは、CJDの診断または脳障害の有用

な血清マーカーを提供する。

【0023】

AMIの症例におけるH-FABPについて開発された敏速な微粒子増強濁度免疫アッセイの使用(Robers, M. et al., 「Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction」, Clin. Chem. 44, 1564~1567 (1998))はアッセイの時間を大幅に減少させた。従って、広く使用されている臨床試験の分析機器(例えば、Hoffmann-La Rocheからの「COBAS」MIRA PlusシステムまたはAbbott laboratoriesからの「AxSYM」システム)における完全自動化は可能であり、そしてCJDの慣用の臨床診断のために適用される。

【0024】

H-FABPまたはB-FABPは、免疫アッセイ以外の手段によって測定され得る。例えば、サンプルは、1または2次元ゲル電気泳動に供され得、そしてFABPの量は、ゲルまたはゲルからのプロットの濃度測定スクリーニングによって見積られ得る。

【0025】

本発明のアッセイは、TSEについての1以上の他の死亡前のアッセイと一緒に使用され得、このアッセイは上記に記載された具体的なこれらのアッセイを包含する。そのように組み合わせた手順は、ウシのような反芻動物におけるBSEを診断することにおいて特に有用である。

【0026】

以下の実施例は本発明を例証する。

【0027】

(実施例1)

(材料および方法)

(患者)

本研究の集団は、年齢および性別を適合させたコントロールの3人の患者(コントロール群)、3人の確認されたAMIの患者(AMI群)、3人の確認された痴呆の患者群(痴呆群)、および3人の確認されたCJDの患者(CJD群)からなった。コントロール群は、2人の男性、46-86歳の範囲で平均66歳、および1人の女性、63歳を含んだ。AMI群は、2人の男性、40-90歳の範囲で平均65歳、および1人の女性、72歳を含んだ。痴呆群は、2人の男性、43-87歳の範囲で平均65歳、および1人の女性、64歳を含んだ。CJD群は、2人の男性、62-74歳の範囲で平均68歳、および1人の女性で、65歳を含んだ。血液およびCSFのサンプルを、それぞれのCJDの患者について収集した。血液サンプルを、乾燥ヘパリン含有の試験管中に収集した。4で15分間、1500gで遠心分離した後、試験管を、分析まで-20で保存した。CJD群からの患者に、CJDの診断を確認するために神経科医による連続的な臨床評価を受けさせた。確認されたAMI(トロポニン-I濃度は2ng/mlを超える)を伴うAMI群からの患者を病院に入院させた。臨床評価を、コントロール群からの全ての患者について実行して、CJDおよびAMIを除外した。

【0028】

(脳および心臓のH-FABPの測定)

H-FABPのレベルを、サンドイッチELISA法によって血漿中で測定した。96ウェルのポリスチレンマイクロプレート(NUNC)を、炭酸緩衝液0.1M pH9.6中で全てのアイソフォームを検出する100μl/ウェルのヤギ抗ヒトFABP(Spectral Diagnosis HC, Ontario, USA)(20μg/ml)を用いて4で一晩被覆した。プレートを、BioRad NOVAPATH™洗浄器上でPBS(15mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-120mM NaCl-2.7mM KCl pH7.4, Sigma)で自動的に洗浄した。全ての洗浄工程を、新鮮なPBSを用いて実行した。非特異的結合部位を、37で2時間、200μl/ウェルの炭酸緩衝液中の2%カゼインでブロックした。洗浄工程の後、このサンプルを、100μl/ウェルでニ

連でピペティングした。このプレートは37℃で2時間インキュベートされた。洗浄工程の後、PBS-1%BSA中の、100µl/ウェルのマウス抗ヒト心臓FABP(クローン66E2、HyCult Biotechnology BV, Uden, Netherlands)(0.3µg/ml)を振とうしながら、室温(R.T)で1時間インキュベートした。洗浄工程の後、PBS中の、100µl/ウェルの、アルカリホスファターゼで標識された抗マウスイムノグロブリン(Dako, Denmark)(1.5mg/ml)は振とうしながら室温で1時間30分インキュベートした。洗浄工程の後、ジエタノールアミン中の、50µl/ウェルのアルカリホスファターゼ基質(すなわち1.5mg/mlパラニトロフェニルホスファターゼ)を添加し、次いでこのサンプルを、30分間インキュベートした。この反応を、100µl/ウェルの1M NaOHで停止した。発色現像を、405nmの波長でマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

#### 【0029】

緩衝液中の「ブランク」アッセイもまた実行した。

#### 【0030】

(CK-MBおよびトロポニン-I測定)

AMIを、臨床評価ならびにトロポニン-IおよびCK-MBの測定によって診断した。サンプルを、15分間1500gで遠心分離し、そして-20℃で保存した。血清CK-MBおよびトロポニン-Iのレベルを、自動化された分析化学機器「AxSYM」システム(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)を用いて蛍光マイクロ粒子酵素免疫アッセイ(MEIA)を使用して検出した。蛍光産物の形成の比率は、サンプル中のトロポニン-Iの量に正比例した。トロポニン-Iに関する検出限界は、0.3µg/lであった。CK-MB測定は、蛍光プローブの量に比例的であり、そして検出限界は0.7µg/lであった。

#### 【0031】

(統計学的分析)

H-FABPのレベルを、平均の±SDとして、または中央値および4分位値

間の範囲としてのどちらかで光学密度測定 (OD) 値で表示した。トロポニン - I および CK - MB のレベルを、濃度の単位 (ng/ml) で表現した。非パラメトリック Mann - Whitney U 検定、および Kruskal - Wallis H 検定を用いて、複数の群間の血漿における H - FABP、トロポニン - I および CK - MB の濃度と比較した。「PRISM」ソフトウェアを用いて、box / whisker および散布図を生成した。Microsoft (登録商標)「EXCEL」のための「Analyse - it」ソフトウェアによって規定された 95% の信頼区間 (CI) および受信者動作特性 (ROC) 曲線を用いて、その指示が識別可能な時点を評価した (Murphy, J. M. et al., 「Performance of screening and diagnostic tests」Arch. Gen. Psychiatry 44, 550 - 555 (1987) を参照のこと)。P < 0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

#### 【0032】

(結果)

(臨床的特徴)

CJD 群からの患者に、完全な臨床評価を与えた。CJD を、検死解剖後に脳の免疫組織学の助力で最終的に診断した。コントロール群からの患者を、病院に入院させ、そして CJD および AMI を、臨床評価によって除外した。

#### 【0033】

高いトロポニン - I のレベル (> 2 ng/ml) が確認された、AMI を伴う AMI 群からの患者を病院に入院させた。

#### 【0034】

アッセイの結果を、以下の表 1 において示す。

#### 【0035】

【表 1】

表 1.

アッセイ型	コントロール群 の血漿	AMI群 の血漿	虚呆群の CSF	CJD群の 血漿	CJD群の CSF
H-FABP 中央値 (25-75%) OD, 405 nm	0.25 (0.23- 0.27)	2.89 (2.70- 3.0)	0.20 (0.16- 0.31)	0.79 (0.74- 0.86)	0.46 (0.38- 0.54)
Troponin-I 中央値 (25-75%) IU ng/ml	0 (0.0- 0.0)	50 (50-359)	0 (0.0-0.2)	0 (0.0-0.2)	0 (0.0-0.2)

AMI群におけるH-FABPの血漿のレベル(OD測定値)は、コントロール群におけるそれぞれのレベルより有意に高かった(表2)。AMI群は、2.89(2.70-3.0)の中央値レベル(25-27%の範囲)のH-FABPを有し、他方、コントロール群は0.25(0.23-0.27)のレベルを有した。CJD群におけるH-FABPの血漿のレベルは、AMI群の傾斜とコントロール群の傾斜との間であった。血漿CJD群におけるH-FABPの中央値(25-27%の範囲)レベルは0.79(0.74-0.86)であった。0.30カットオフ値を超えたH-FABPレベルの感受性、特異性および予測精度は、それぞれ100%、100%および100%であった。AMI群とコントロール群との間のH-FABP濃度の相違を確認するために、トロポニン-Iをアッセイした。さらに、AMIおよびCJDを識別するために、2つのアッセイを、CJDサンプルについても行った。トロポニン-Iの濃度を、それぞれの群において測定した。AMI群におけるトロポニン-Iの濃度は、コントロール群における濃度より有意に( $P > 0.01$ )高かった。

## 【0036】

## (考察)

上記の結果は、H-FABPがCJDについての陽性マーカーであることを示す。H-FABPは、数年前、急性心筋梗塞のマーカーとして提唱していたこと

から、CJDおよびAMIは、トロポニン-IおよびCK-MBのような別のAMIの生化学的なマーカーによって識別されなければならなかった。CJDに関するAMIの識別後、血清およびCSF H-FABPの濃度は、CJDの特異的マーカーとして使用され得た。

#### 【0037】

本研究において、H-FABPのアッセイは、100%の感受性、特異性および予測精度(OD応答>0.30)を可能とした。これらの値は、CJDの死亡前の検出の別の方法(タンパク質14-3-3(ダイマーのホスホセリン結合タンパク質)を利用する)において得られた値より有意に高い。この方法は、抗14-3-3抗体タンパク質を用いてイムノブロットングする工程を包含する。3人の痴呆患者は、抗14-3-3イムノブロットングに対して陽性であった。14-3-3の特異性は、CJDに限定されず、これらはまた、アルツハイマー痴呆症、頭部の損傷からの大脳合併症、およびいくつかの他の痴呆の形状を会合する。

#### 【0038】

急性心筋梗塞は、心臓のトロポニン-I、クレアチンキナーゼMB、ミオグロビンおよび最近ではH-FABPアッセイのような生化学的マーカーのアッセイの助力で診断される。CJDに関するH-FABPのレベルは、AMIで干渉され、そしてAMIとCJDとの間の識別を、他のAMIマーカーの使用により行った。

#### 【0039】

(実施例2)

血漿またはCSFのサンプルを、ヒトの患者から摂取した。患者が罹患していた疾患は、検死解剖によって決定されるようにいくつかの場合において、散発的(SP)または新しい改変型(V)であれ、明確にCJDのどちらかであった。他の症例(「CJDではないかもしれない」)において、患者を、CJDを有しないとして診断したが、これらの患者のいく人かはまだ生存しているので、これを検死解剖によって確認する必要性はない。サンプルを、抗14-3-3の先行技術の方法、および本発明によってCJDに関してアッセイした。

## 【0040】

抗14-3-3のイムノブロットを、Tris-SDS-グリシン緩衝液中の12%のSDS-PAGEゲル上でサンプルを流すことによって実行した。その後、タンパク質を、CAPS緩衝液中でPVDFメンブレン上に、3時間、一定の200mAでセミドライのエレクトロブロットティングによって移した。そのメンブレンをブロッキングし、抗14-3-3のポリクローナルウサギIgG抗体(Santa Cruz, Inc. (Cat sc 629, Lot L117))とともにインキュベートし、緩衝液で洗浄し、そして第二の抗体(西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されるヤギ抗ウサギイムノグロブリン(Dako, Denmark))でインキュベートした。次いで、このメンブレンを再度洗浄した。それぞれのインキュベーション後の洗浄工程を、5%の「Tween」を含むPBS緩衝液(pH7.2)で素早く3回、および各回につき5分間で5回行った。次いでペルオキシダーゼを、Boehringer Mannheimキット「BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)」を使用し、標準的な増幅された化学発光法でアッセイした。観察された発光物質は、イムノブロットティングにおける陽性の結果を表示した。

## 【0041】

本発明の方法は、適用される感受性カットオフ(ROC曲線を使用して)が、血漿のサンプルに関して $OD > 0.2$ 、およびCSFのサンプルに関して $OD > 0.1$ であったことを除き、実施例1において記載したとおりであった。表2は結果を示す。

## 【0042】

表2を参照して、抗14-3-3試験を、本発明者の研究室における異なる操作によって、2回実行し、同じ結果を生じた。抗14-3-3の結果と抗H-FABPの結果との間の相関の結果は、その結果がなかったサンプルCSF-10を除き、ほぼ100%であった。血漿のサンプルは、抗14-3-3の試験で陰性を与えたうち、4つの場合において抗H-FABPを用いて陽性を与えた。このことは、抗14-3-3の試験は、全ての場合において真の結果を与えている

とはいえないことを意味し得る。

【0043】

【表2】

表 2

サンプル名	疾患の符号	抗14-3-3 免疫ブロット (先行技術)*	抗H-FABP ELISA法 (本発明)
PLAS2	vCJD	陰性	陽性
PLAS3	vCJD	陰性	陰性
PLAS4	vCJD	陰性	陽性
PLAS5	spCJD	陽性	陽性
PLAS6	spCJD	陰性	陰性
PLAS7	spCJD	陽性	陽性
PLAS9	CJD(変異型)	陽性	陽性
PLAS10	CJD(変異型)	陽性	陽性
PLAS11	CJD(変異型)	陰性	陽性
PLAS12	CJD(変異型)	陰性	陽性
CSF1	spCJD	陽性	陽性
CSF2	spCJD	陽性	陽性
CSF3	spCJD	陽性	陽性
CSF4	spCJD	陽性	陽性
CSF5	spCJD	陽性	陽性
CSF10	vCJD	陽性	陽性
CSF11	vCJD	陽性	不明瞭
CSF12	vCJD	陽性	陽性
CSF6	CJD(変異型)	陰性	陰性
CSF7	CJD(変異型)	陽性	陽性
CSF8	CJD(変異型)	陰性	陰性
CSF9	CJD(変異型)	陰性	陰性
CSF13	CJD(変異型)	陰性	陰性
CSF14	CJD(変異型)	陰性	陰性

\*異なる研究者によって、2回行われ、同一の結果を得た。

【0044】

(実施例3)

本発明の方法を、BSEを有すると診断された4頭のウシ、およびコントロールとして3頭の健全なウシからのプールし、濃縮したCSFのサンプルについて実行した(そのサンプルは、シグナルをバックグラウンドの比率まで増加させるため、「Microcon」(Amicon)を用いて濃縮した)。

【0045】

ラット/マウスH-FABPのELISAキット(Hycult Biotechnology B.V., Uden, The Netherlands)を、製造業者の取扱説明書(実施例1において記載したサンドイッチELISA法に原則的に類似しているアッセイ)に従って使用した。しかし、ウェルに結合した第一の抗体は、抗ヒトH-FABPではなくて抗ラット/マウスH-FABPであり、そして第二の抗体は、抗ラット/マウスを標識したペルオキシダーゼであった(これらの抗体は、ラットおよびマウスの両方に対して抗ラット/マウスであるように見える。このキットは、ウシのH-FABPを検出することを目的としないことを説明すべきである。抗ラット/マウスH-FABP抗体が、ウシのH-FABPを認識することは、本発明において予想外に見いだされた)。そのアッセイは、SMP基質を使用し、そして450nmでの読み取り値を用いて比色分析する。

【0046】

表3で示された結果は、再現アッセイの平均であり、そして健全なウシと比較してBSEに冒されたウシに関して観察された相違を明確に示唆した。

【0047】

【表3】

表 3

サンプル	平均強度	変動係数
ブランク (PBS)	0.172	3.6 %
健全な CSF	0.178	11.8 %
健全な CSF	0.189	2.4 %
BSE CSF	0.304	1.5%
BSE CSF	0.576	4.0%
BSE CSF	0.465	10.8%
ウシの心臓 (10 mg/ml.)	2.872	2.0%
ブランク (PBS)	0.178	2.1%

それぞれ上記の引用された刊行物は、本明細書中において、その刊行物の各々が本明細書中において依拠する程度で参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図は、(a) CJDもAMIも、どちらも有しないコントロール群 (b) AMIを有する群、および (c) CJDを有する群に関して、本発明の方法によって決定されたように、405 nmの光学密度測定によって表されたH-FABPの濃度のy軸上でのグラフ表示である。

【図1】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 01/02894
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OHKARU Y ET AL: "Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of human heart type fatty acid-binding protein in plasma and urine by using two different monoclonal antibodies specific for human heart fatty acid-binding protein" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 178, no. 1, 13 January 1995 (1995-01-13), pages 99-111, XP004021129 ISSN: 0022-1759 page 104, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 1 --- -/--	1-8
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 September 2001		Date of mailing of the international search report 27/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 01/02894

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PU LIXIA ET AL: "Expression of fatty acid binding proteins is altered in aged mouse brain." MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 198, no. 1-2, August 1999 (1999-08), pages 69-78, XP001024351 ISSN: 0300-8177 cited in the application abstract page 72, column 1, paragraph 2	1-8
A	FR 2 763 692 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH) 27 November 1998 (1998-11-27) claim 1	1-8
A	WO 99 04237 A (PREDDIE ENRIQUE R ;BERGMANN JOHANNA E (DE)) 28 January 1999 (1999-01-28) claims	1-8

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/02894

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2763692	A	27-11-1998	FR 2763692 A1	27-11-1998
			AU 7774298 A	11-12-1998
			WO 9853324 A1	26-11-1998
WO 9904237	A	28-01-1999	CA 2206774 A1	16-12-1998
			AU 8972998 A	10-02-1999
			WO 9904237 A2	28-01-1999
			EP 1062517 A2	27-12-2000
			JP 2001501314 T	30-01-2001

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ツィンマーマン, カトゥリーヌ ガブリエル  
スイス国 セーアッシュ - 1286 ジュネーヴ, リュ ドゥ フォバーグ 8

(72)発明者 ギローム, エリザベス  
フランス国 エフ - 74100 アンヌマッス, リュ ドゥ カピテーヌ シャルル ドゥブラツ, 8アー

专利名称(译)	传染性海绵状脑病的诊断分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003526788A</a>	公开(公告)日	2003-09-09
申请号	JP2001566030	申请日	2001-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	单威赛引用和日内瓦		
申请(专利权)人(译)	Université de Genève 酒店		
[标]发明人	ホーホシュトラーサードウニフランソワ サンチェジャンシャルル ツインマーマンカトゥリーヌガブリエル ギロームエリザベス		
发明人	ホーホシュトラーサー, ドウニ フランソワ サンチェ, ジャン-シャルル ツインマーマン, カトゥリーヌ ガブリエル ギローム, エリザベス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2828 Y10S436/811 Y10S436/819 Y10T436/106664		
FI分类号	G01N33/53.W G01N33/53.D G01N33/543.545.A		
优先权	2000005683 2000-03-10 GB 2000006064 2000-03-14 GB		
其他公开文献	JP4575635B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

心脏和大脑的脂肪酸结合蛋白 ( H-FABP , B-FABP ) 是TSE ( 尤其是 CJD ) 的标志物。 本发明提供了通过酶免疫测定法的诊断测定法，其对于这些标记中的任一种优选使用针对H-FABP , B-FABP的特异性抗体。由于H-FABP还是急性心肌梗塞 ( AMI ) 的标志物，因此将CJD与AMI区分是AMI特有的 ( 例如，使用肌钙蛋白1或CK-MB作为标志物 ) 。 ) ，需要再次执行。

